

上述の本発明のプロープ保持デバイスに血流計プローブを配置して血流測定デバイスを構成し、これを用いてラットのMCAOモデル実験を以下の要領で実施した。使用したデバイスは、図1および図2に示す保持デバイスであるが、1つのプロープ保持部材のみから成るものであった。即ち、血流計プローブ12およびプロープ保持部材14のみから構成されるものであった。尚、導線24を血流計に接続した。

[0044] 1. 手術の準備

イソフラン濃度5%の酸素を用いてラットを麻酔した。その後、気管挿入して30%の酸素および70%の窒素を含む混合ガスを用いて肺を人工呼吸させ、イソフランの呼気終末濃度を2.5%に下げた。表面加熱または冷却によって頭蓋周囲の温度を自動制御して37.0℃とした(モン・ア・サーム(Mon-a-therm)7000(マリンクロット社(Mallinckrodt Inc.)製)を使用)。ポリエチレンカテーテルを用いて尾骨動脈にカニューレを挿入した。後述のMCAOの間、動脈圧をモニターし、動脈血を間欠的にサンプリングして血液ガス、血糖値およびヘマトクリットをチェックした。

[0045] 2. MCAOの準備

Zea-Longaらの方法に基づくMCAOのために全てのラットに手術を施した。手術用顕微鏡を使用して、中央線気管前切開(middle pretracheal incision)によって総頸動脈(CCA)を露出させた。そして、動脈から迷走神経および交感神経を注意して離した。総頸動脈の分岐点から脳側2mmの箇所を外頸動脈(ECA)を結紮した。内頸動脈を末梢側に剥離し翼口蓋動脈(PPA)の根部を露出させた。

[0046] 次に、分岐点から心臓側5-10mmの箇所で総頸動脈(CCA)を永久的に結紮し、翼口蓋動脈を根部に近接して5-0ナイロンモノフィラメント糸で結紮した。動脈血酸素分圧(PaO_2)および動脈血二酸化炭素分圧(PaCO_2)、pH、血漿グルコース濃度、ヘマトクリット、収縮期動脈圧、心拍数のベースライン値を測定した。小さい動脈切開部から右総頸動脈にシリコーン被覆した直径0.25mmのナイロンモノフィラメントを挿入した。

[0047] ラットの第1のグループ(12匹)に関しては、LDFモニターをしないでMCAOを4週間実施した経験を有する検査員によってMCAOを実施した。非特許文献1および2に記載されているように、フィラメントを頸動脈の分岐点から挿入して僅かに抵抗を感

じるまで約18〜20mm進めた。他方、ラットの第2のグループ(12匹)については、同じ試験員が以下に説明するように、LDFをモニターしながらMCAOを実施した。

[0048] 3. 第2グループのrCBFモニタリング

右MCAの栄養領域であるの右脳の大脳皮質に関するMCAOの準備の前に、LDFの薄いプローブを配置した平坦な矩形シートである本発明の血流測定デバイスを、側頭筋と側頭骨との間に脳側に向かって超音波が照射されるように配置した。

[0049] 矩形シートは、ポリプロピレン製であり、その寸法は7.5mm×3.5mm×1.0mm(厚さ)であった。この矩形シートには、LDFプローブおよびそのための導線の形状と相補的な凹部が形成され、その凹部にプローブおよび導線が押し嵌めまたはスナップフィットによって嵌まり込むように凹部を形成した。

[0050] 使用したプローブは、一般的に脊髄の血流量を測定するためにユニーク・メディカル社(Unique Medical Inc.、東京)から製品名:Type-CSで市販されているものであった。ラットの頭部の皮膚を切開して頭蓋骨を露出させ、側頭骨と側頭筋との間の片側のナチュラル・ポケットに矩形シートを入れてプローブから発射される超音波が脳に照射されるように配置した。その後、側頭筋が矩形シートを介して側頭骨に押された状態で頭皮を縫合した後、ラットを仰向け状態としてMCAOモデルとした。

[0051] MCAO操作の開始前から再灌流後30分まで1.0秒毎にrCBFを測定した。次に、シリコーン被覆した4-0ナイロンフィラメントを塞栓糸として挿入し、レーザードップラーからの出力がベースライン値の20%減少するまでフィラメントを進めた。レーザードップラーからの出力が急激に増加する場合には、早期の再灌流であると判断されるので、フィラメントの位置を再調整した。

[0052] 双方のグループにおいて、イソフランの呼気終末濃度が1.0%に下がった。45分の虚血時間の後、フィラメントを総頸動脈から抜去した。再灌流後30分に動脈カニューレおよびLDFプローブ(第2グループのみ)を除去して傷口を再縫合した。その後、イソフランの供給を止めた。自発呼吸の回復を確認した後、人工呼吸装置を外し、気管内挿管を取り外した。

[0053] ラットを加熱・加湿インキュベータに移し、そこに酸素を定常的に供給した。インキュベータ内でラットは麻酔から覚め、その後2日間飼育し、その後、組織学的脳検査に

付した。

[0054] 虚血を誘発させてから2日後、神経学的評価を実施した。5%のイソフランを含む酸素によりラットを麻酔して断首した。速やかに脳を取り出してクモ膜下出血の有無を確認した。ティッシュ・チョッパーを用いて1mm間隔で脳を輪切りにして薄いセクションを得、トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) の2%溶液中で20分間インキュベートして生体染色した。

[0055] TTCで染色した脳セクションを3-CCDカラービデオ (PDMC 1e、ポラロイド社 (Polaroid Co. Inc.) 製) で記録して障害面積を計測した。(障害領域であると考えられる) TTCで赤く染まらなかった領域の面積をビデオ画像解析システム (NIH Image, version 1.52) により算出した。ラット1匹当たりの全てのセクションのTTC染色領域とセクションの厚さを用いて、全障害領域の体積 (単位: mm^3) を算出した。

[0056] グループ間における生理学的変数および障害体積の相違の有意性を評価するために、対応の無いt検定 (unpaired t test) を使用した。LDFの変化を評価するために、対応の有るt検定 (paired t test) を使用した。後述のグラフ (図7) において示した値は、平均±標準偏差 (SD) であり、 $p < 0.05$ の両側値が有意であると考えられる。

[0057] 4. 結果

全ての生理学的変量は、正常範囲内であった。実験を通じて2つのグループ間で血圧、動脈血ガスまたは血漿グルコース濃度に関して統計的に有意な相違は認められなかった。第1グループのラットの内、3匹は、MCAO後の48時間以内に死亡した (死亡率25%)。従って、これらのラットについては、組織病理学的な分析を実施しなかった。第2グループの全てのラットは、MCAO後48時間生存した。生存したラットについては、クモ膜下出血は認められなかったが、第1グループの死亡した3匹の内2匹についてはクモ膜下出血が認められた。

[0058] LDFによって測定したrCBFの代表的な記録を図5に示す。図5において、縦軸はrCBF (単位脳重量当たり、また、単位時間当たり) を示し、横軸は、後述の図6と同様に、時間を示す。rCBFは、CCAの牽引によって減少し (図5のb)、また、CCAの結紮によって減少し (図5のc)、更に、挿入したフィラメントによっても減少した (図5のe)。他方、ECAの結紮 (図5のa) およびPPAの結紮 (図5のd) の場合は、頭蓋外血液

流を表すため、LDFの値は低下しなかった。図5は、本発明のプロープ保持デバイスを使用すると、牽引、弛緩、結紮、フィラメントの挿入および抜去に対応して変化する、あるいは変化しないrCBFを測定できることを示す。このことは、本発明のプロープ保持デバイスを使用することによって、rCBFを適切に測定できることを意味する。

[0059] 図6は、第2グループについてLDFによって測定されたrCBFの動的変化(dynamic change)を示す。図6において、縦軸は、図5と同様にrCBF(但し、ベースライン値に対する割合)を示し、横軸は時間を示す。図6において、*はベースラインに対して有意に減少した事を意味し、併せて標準偏差の幅も示している。rCBFは、CCA結紮の後、ベースライン値の $22 \pm 12\%$ 減少し(図6の(4))、フィラメントを進めた後、ベースライン値の $80 \pm 10\%$ 減少した(図6の矢印)が、ECA結紮(図6の(2))またはPPA結紮(図6の(6))の場合、元の値から変化しなかった。図6から、本法により得られる脳血流測定法が再現性が高い事が判る。

[0060] 図7に、皮質および皮質下に関する上述の障害体積の算出結果を示す。縦軸は障害体積を示す。第2グループに関して、皮質の損傷体積は $167.21 \pm 48.54 \text{ mm}^3$ (平均 \pm 標準偏差)であり、第1グループの $112.77 \pm 36.03 \text{ mm}^3$ ($P=0.026$)より相当大きかった。皮質の障害体積の変動係数(coefficient of variation)は、第1グループ(35%)より第2グループ(31%)の方が小さかった。このことは、第1グループより第2グループの方がより再現性が有ることを意味する。

[0061] 脳皮質下の障害体積は、双方のグループでは同様であった(第1グループ: $71.90 \pm 9.68 \text{ mm}^3$;第2グループ: $59.68 \pm 21.77 \text{ mm}^3$ 、 $P=0.57$)が、障害体積の変動係数は、第1グループ(36%)より第2グループ(13%)の方が小さかった。

[0062] 実施例2

図8に示すように、プロープ保持デバイス10のブリッジ部分16の領域40にジグザク状に線状の電気抵抗体を加熱要素として配置し、また、温度センサー44も配置し、これらをシリコーン樹脂で覆ってデバイスを得た。先と同様に、全身麻酔したラットの頭部の皮膚を切開して頭蓋骨を露出させ、側頭骨と側頭筋との間の両側のナチュラル・ポケットにプロープ保持部材を配置することによって、得られたデバイスをラットに取り付けた。

- [0063] 温度センサー44の検知温度が37.0℃になるように、加熱要素の加熱量を制御したところ、3時間半の酸素-空気-イソフルレン麻酔の間、ラットの直腸温は当初の37℃から34.5℃に低下したが、側頭筋下温は最低で36.8℃であり、脳温を良好に維持できることが確認できた。

産業上の利用可能性

- [0064] 本発明のデバイスは、ラット等の動物を用いて脳内血流を測定する場合に、従来の測定より非常に簡単に装着でき、その結果、MCAOモデルの実験等のドップラー血流計を簡単に用いることができるので、実験の再現性および信頼性が向上する。従って、実験全体を短期間に、また、安価に終了させる事が可能である。

関連出願の相互参照

- [0065] 尚、本願は、日本国特許出願2003-414819(出願日:2003年12月12日、発明の名称:脳内血流測定デバイス)に基づくパリ条約上の優先権を主張し、この日本国出願に開示された内容は、ここで参照することによって、本明細書に組み込まれる。

請求の範囲

- [1] 血流計プローブを保持するプローブ保持部材を有して成り、脳内の血流を測定する際に、血流計プローブと共に用いるプローブ保持デバイスであって、プローブ保持部材は、血流計プローブを保持した状態で、側頭骨に隣接してその外側に配置できることを特徴とするプローブ保持デバイス。
- [2] 2つのプローブ保持部材を有して成り、これらのプローブ保持部材を橋渡しして一体に保持するブリッジ部分を更に有して成る請求項1に記載のデバイス。
- [3] プローブ保持部材およびブリッジ部分はそれぞれシート状形体であり、ブリッジ部分の各縁部に沿って各プローブ保持部材の縁部が一体に接続された状態に形成されている請求項1または2に記載のデバイス。
- [4] デバイスは断面U字形状を有し、ブリッジ部分がU字の底部に対応し、プローブ保持部材はU字の底部の両端から上向きに延在する脚部に対応する請求項1〜3のいずれかに記載のデバイス。
- [5] シート材料を屈曲することによって断面U字形状を有するようにした請求項1〜4のいずれかに記載のデバイス。
- [6] プラスチック材料でできている請求項1〜5のいずれかに記載のデバイス。
- [7] プローブ保持部材は、プローブを嵌め込むことができる、プローブの形状と相補的な凹部を有する請求項1〜6のいずれかに記載のデバイス。
- [8] プローブ保持部材は、温度センサーをも保持できる請求項1〜7のいずれかに記載のデバイス。
- [9] 血流計プローブは、レーザードップラー血流計のプローブである請求項1〜8のいずれかに記載のデバイス。
- [10] 血流計プローブは、超音波ドップラー血流計のプローブである請求項1〜8のいずれかに記載のデバイス。
- [11] プローブ保持部材は、側頭筋と側頭骨との間に配置できる寸法を有する請求項1〜10のいずれかに記載のデバイス。
- [12] ラットまたはマウスの側頭筋と側頭骨との間に配置できる寸法を有する請求項1〜11のいずれかに記載のデバイス。

- [13] ブリッジ部分は、加熱要素を更に有して成る、請求項2〜12のいずれかに記載のデバイス。
- [14] (1)請求項1〜13のいずれかに記載のプロープ保持デバイス、および
 (2)血流計プロープ
 を有して成る、血流測定デバイス。
- [15] 血流計プロープは、レーザードップラー血流計または超音波ドップラー血流計のプロープまたはである請求項14に記載の血流測定デバイス。
- [16] プロープ保持部材は、温度センサーを更に有して成る請求項15に記載の血流測定デバイス。
- [17] 請求項1〜13のいずれかに記載のプロープ保持デバイスに用いるプロープ保持部材の製造方法であって、
 血流の測定を実施すべき動物の側頭筋と側頭骨との間に形成される空間に対応する原型を得、
 得られた原型に基づいてプラスチック材料を成形することによってプロープ保持部材を得る
 ことを特徴とする製造方法。
- [18] 原型は、側頭筋と側頭骨との間に形成される空間に硬化性材料を注入して、その空間内で硬化性材料を硬化させることによって得る請求項17に記載の製造方法。
- [19] 硬化性材料は、シリコーン樹脂である請求項18に記載の製造方法。